

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



**Prioritätsbescheinigung
DE 101 56 678.6
über die Einreichung einer Patentanmeldung**

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

Aktenzeichen: 101 56 678.6

Anmeldetag: 12. November 2001

Anmelder/Inhaber: MOLOGEN Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH

Bezeichnung: Mittel zur Verbesserung der Immunantwort

Priorität: 02. Oktober 2001 DE 101 48 697.9

IPC: A 61 K 39/39, A 61 K 48/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der Teile der am 12. November 2001 eingereichten Unterlagen dieser Patentanmeldung unabhängig von gegebenenfalls durch das Kopierverfahren bedingten Farbabweichungen.

München, den 8. Januar 2007
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



A 9161
11/06
Pat/GBM

Strassme
BEST AVAILABLE COPY

Mittel zur Verbesserung der Immunantwort

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Verbesserung der Immunantwort durch Kopplung von transfervermittelnden Molekülen an Genexpressionskonstrukte.

Die Erfindung betrifft das Gebiet der genetischen Immunisierung.

- Die genetische Immunisierung beruht auf dem Prinzip, dass nicht wie herkömmlich
- 5 geschwächte Erreger oder diese charakterisierende Antigene, sondern nur noch Genexpressionskonstrukte geimpft werden. Diese kodieren für immunogene Proteine viraler, bakterieller oder parasitärer Erreger oder bei malignen Erkrankungen spezifisch exprimierter bzw. präsentierter Antigene. Dem Impfling wird somit lediglich die genetische Information zur Herstellung des fremden Proteins verabreicht,
- 10 worauf die Körperzellen das fremde Protein selbst herstellen und anschließend gegen dieses körperfremde Protein eine effiziente Immunantwort ausgebildet wird.

Hintergrund der Erfindung

- Der Schutz vor Infektionskrankheiten und auch das Prinzip der Immunisierung beruhen auf der Wiedererkennung von Strukturen von in der Vergangenheit erfolgreich
- 15 bekämpften Erregern durch das Immunsystem.

- Dabei werden zwei Hauptwege unterschieden: Das humorale, welches auf der Synthese von Antikörpern durch B-Lymphozyten aber auch humoralen Komponenten der nicht-adaptiven Immunität, dem Komplementsystem, beruht, und das zelluläre Immunsystem, welches auf der Aktivität von T-Lymphozyten, NK-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems beruht. T-Lymphozyten sind in der Lage, mit Viren infizierte Zellen zu erkennen. Man weiß heute, daß der zelluläre Arm des Immunsystems durch Aktivierung von sog. Typ- 1- Helferzellen, und der humorale Arm durch Aktivierung von sog. Typ-2-Helferzellen induziert wird (Mosmann et al., J. Immunol.1986, 136(10): 3561-6). Entsprechend wird der zelluläre Arm auch als Th1 pathway und der humorale Arm als Th2 pathway bezeichnet. Extrazellulär vorliegende Bakterien werden in der Regel durch den Th2 Arm bekämpft. Der Th2 Arm ist ebenso wichtig für die Neutralisierung von Bakteriengiften und für die Bekämpfung verschiedener Parasiten, die sich im extrazellulären Raum im Körper befinden.
- 15 Infektionserreger, die sich vor allem intrazellulär aufhalten, wie es für einzelne Bakterienarten und alle Viren bekannt ist, werden dagegen hauptsächlich durch den Th1 Arm, also durch zytotoxische Zellen, bekämpft.

- Zum Einschleusen („Transfektion“) der die immunogenen Antigene oder Teile davon kodierenden DNA in Zellkerne antigenpräsentierender oder sonstiger somatischer Zellen sind verschiedene chemische, physikalische und biologische Transfektionsmethoden bekannt.

- Mittel zur Transfektion, sog. Genfähren, sind virale Vektoren, Plasmide oder kovalent geschlossene minimalistische DNA-Konstrukte (vgl. EP 0914 318 B1; im folgenden als MIDGE® (MINIMALISTIC IMMUNOLOGICALLY DEFINED GENE EXPRESSION VECTORS) bezeichnet). Wildtyp-Viren und eng mit ihnen verwandte Vektoren zeigen eine in der Regel hohe Transfektionseffizienz und gute Gewebespezifität, sind allerdings aufgrund von Sicherheitsbedenken und dem Problem der gegen den Vektor auftretenden Immunität umstritten. Diese letzteren Probleme treten bei der Verwendung von „nackter“ DNA nicht auf. Bei der in vivo wie auch der in vitro Transfektion mit solchen in der Regel von Plasmiden abgeleiteten Systemen stellt sich das Problem der effizienten sowie zellart- oder gewebespezifischen Transfektion. Aus diesem Grunde wurde versucht, die auf DNA beruhenden Trans-

fektionsmethoden zu optimieren. Verschiedene Peptide und andere organische Moleküle wurden an Genföhren über unterschiedliche Bindungsarten gekoppelt. Ebenso wurden durch Kopplung von Liganden, die Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen zur verstärkten Aufnahme der Genföhren, ausgenutzt (Fraser et al., 1998, Semin. Immunl., 10 (5): 363-72).

Durch kovalente Kopplung des Kernlokalisationsignals (NLS) aus dem SV 40 Virus an für das Hepatitis small surface Antigen (HBsAg) kodierende Expressionskassetten konnte ein 10- bis 15-fach erhöhter Antikörpertiter nach intramuskulärer Applikation nachgewiesen werden (Schirmbeck et al., J. Mol Med. 2001 Jun;79 (5-6):343-50). Es wurde ein Unterschied in der Isotypenverteilung der Antikörperantwort gefunden, mit einer starken Übergewichtung des Th2-spezifischen IgG1-Subtyps nach intradermaler Applikation mit partikelgebundener DNA („Gene-Gun“), und einem Übergewicht an Th1-typischem Subtyp IgG2a nach intramuskulärer Applikation. Es wurde kein Unterschied der Subtypenverteilung gefunden, der mit den Vektoren (Plasmid, minimalistischer Vektor) korrelierte.

Ebenso wurde das elf Aminosäuren lange T-Peptidfragment (YGRKKRRQRRR) des HIV-1 Genprodukts TAT verwendet, um 200nm große Liposomen in Zellen einzuschleusen. Die erfolgreichen Experimente verlangten jedoch eine Konzentration von rund 500 T-Peptiden pro Liposom (Torchilin et al., PNAS 2001, 98(15): 8786-8791). Der Nachweis, dass es eine Membran-durchdringende Funktion aufweist, welche den Transport von Proteinen oder Peptiden in Zellen unterstützt, gelang Frankel (Frankel et al., 1988, Cell. 55: 1179-1188, Green et al., 1988, Cell. 55: 1179-1188, US 5670617).

Es ist für die Impfung bzw. Immuntherapie verschiedener Krankheiten offenbar vorteilhaft, eine Th1-typische Immunreaktion zu erzeugen. Insbesondere gilt dies für intrazelluläre Parasiten wie Leishmania und Malaria, sowie virale Erkrankungen wie HIV. Jedes Mittel, welches die Ausprägung der Th1-Antwort nach Injektion von DNA verstärkt, ist in diesem Sinne vorteilhaft für die Erzeugung eines wirkungsvollen Impfschutzes.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Mittel zur Verfügung zu stellen, welches eine pro Menge eingebrachter DNA-Expressionskonstrukte stärkere sowie vermehrt zellulär

vermittelte (Th1) Immunantwort erzeugt als die im Stand der Technik zur Verfügung stehenden Mittel.

Gelöst wird die Aufgabe durch die unabhängigen Ansprüche.

- 5 Es wurde gefunden, dass durch die kovalente Bindung eines Peptides mit einer Proteintransduktionsdomäne oder einer Kernlokalisationsdomäne an die Haarnadelschleife von kovalent geschlossenen DNA Konstrukten (MIDGE), welche ein Impfantigen kodieren, und anschliessender Impfung der Konstrukte in ein Tier, die Art und Stärke der resultierenden Immunantwort signifikant in Richtung einer zellulären Immunantwort verändert wird.

- 10 Es wurde das überraschende und nicht zu erwartende Ergebnis gefunden, dass das transduzierende Sequenzelement des TAT Peptides ein Nukleinsäurekonstrukt transportieren kann, welches um Größenordnungen größer ist als sein natürliches Substrat. Dieses Ergebnis war deswegen nicht zu erwarten, weil bisherige Untersuchungen nur mit wesentlich kleineren Molekülen einen Effekt zeigten. Dowdy et al.
- 15 zeigten, dass die Fusion dieser Peptidsequenz an Proteinmoleküle ausreichend ist, um ein 120 kDalton großes Protein in Zellen zu transportieren (Dowdy et al. 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21 (2): 45-8). Es sollte daher überprüft werden, ob das von TAT abgeleitete T-Peptid auch in der Lage ist, nochmals erheblich größere DNA-Expressionskonstrukte zu transduzieren. Diese Annahme ist schon wegen der Molekülgröße (für ein 1800 bp großes Expressionskonstrukt liegt diese bei ca. 1,2 MDalton) sowie die vollkommen andere Molekülform weder trivial noch naheliegend. Während Proteine und Peptide nämlich allgemein in globulärer Form vorliegen, sind nicht topologisch gespannte DNA-Moleküle in erster Näherung als lineare Moleküle zu betrachten. Hinzu kommt für die Betrachtung ihrer Verschiedenheit von Proteinen
- 20 noch die Oberflächenladung durch die Phosphatgruppen, die DNA zu einem stark negativ geladenen Molekül machen.
- 25

- Ferner wurde aus dem Simian Virus SV-40 eine Peptidsequenz charakterisiert, welche ein Kern-Lokalisierungssignal (Nuclear Localization Signal = NLS) darstellt. Das Vorhandensein solcher Signalsequenzen, die für den Import von Proteinen in den Zellkern notwendig sind, sind aus mehreren Organismen bekannt. Moleküle, die größer als 60 kDa sind, können nur mit Hilfe einer Kern-Signalsequenz in den Zellkern transportiert werden. Speziell für das SV-40-NLS wurde gezeigt, dass Proteine
- 30

bis zu 465 kDa zum Zellkern gesteuert werden (Lanford et al. 1986, Cell 15; 46 (4): 575-82). Diese Fähigkeit des Peptids wurde hier durch Kopplung an DNA für die Verbesserung des Gentransfers genutzt. Die verwendete Peptidsequenz ist PKKKRKV.

- 5 Das zugrundeliegende Verfahren zur Herstellung derartiger Nukleinsäurekonstrukte zur Transkription von RNA-Molekülen in einer Zelle oder einem Zellverbund beruht auf der EP 0 941 318 B1, wobei das Nukleinsäurekonstrukt

- 10
- aus einem zirkulären Strang Desoxyribonukleinsäure mit einer teilweise zueinander komplementären, antiparallelen Basensequenz besteht, so dass ein hantelförmiges Konstrukt entsteht,

- wobei der zueinander komplementäre, antiparallele Basenabschnitt im wesentlichen aus einem Promotor, einem kodierendem Bereich und entweder einem Poly(A)-Additionssignal oder einer anderen RNA-stabilisierenden Sequenz besteht,

- 15
- und der nicht komplementäre Basenabschnitt zwei Schleifen ('Haarnadelschleifen') einzelsträngiger Desoxyribonukleinsäure bildet, die jeweils das 5'- und 3'-Ende des komplementären, antiparallelen Basenabschnitts kovalent miteinander verbinden,

besteht, wobei

- 20
- mit Hilfe wenigstens eines der folgenden Oligonukleotide (ODN 1 oder ODN 2)

ODN 1: 5'-PH-GGG AGT CCA GT XT TTC TGG AC

ODN 2: 5'-PH-AGG GGT CCA GTT TTC TGG AC,

- 25
- wobei X ein Aminogruppen (NH₂)-modifiziertes aktiviertes Nukleosid (Thymin) kennzeichnet,

die Haarnadelschleife ausgebildet wird,

- und mittels eines Crosslinkers wenigstens eine organische Molekülverbindung kovalent mit dieser Haarnadelschleife verbunden wird.

5 Dieses Verfahren ermöglicht die kovalente Bindung von Molekülen an die Nukleinsäurekonstrukte. Die kovalente Bindung ist aus den oben beschriebenen Gründen deutlich bevorteilt; Grund hierfür dürfte die Erhöhung der Effektivität der Transfektion und damit auch letztlich der Transkription aufgrund der starken kovalenten Bindung sein. Der beobachtete Effekt lässt sich nach Beobachtungen der Anmelderin durch Kopplung einer Reihe weiterer basischer Peptide erzielen, so dass die Erfindung nicht auf die Verwendung der beiden beschriebenen Peptidsequenzen be-
10 schränkt ist.

In vivo Versuche in Mäusen mit für HBsAg kodierende MIDGE Vektoren, sowie Impfversuche gegen Leishmania major mit dem p36 LACK Antigen, bestätigten die theoretischen Überlegungen. Erfindungsgemäß waren an die Vektoren verschiedene Peptide kovalent gekoppelt. Ein effektiver und dabei sicherer Impfschutz wurde
15 durch den Vergleich verschiedener Impfbereitungen ermittelt. Parameter waren die Stärke des Th2/Th1 shifts und der erreichte Immunschutz, der anhand der Größe der Läsionen nach der Belastungsinfektion mit Leishmania major Promastigoten ermittelt wurde.

20 Während der Präsentation von Antigen durch Antigen-Präsentierende Zellen (APC), aus naiven T-Helferzellen kommt es bereits zu einer Prägung der T-Helferzellen in Richtung auf eine Th1 (zytotoxische) oder Th2 (humorale) Immunantwort. Bestimmend für diese Prägung ist u.a. das Zytokinmilieu, in dem die Interaktion zwischen APC und Helferzelle stattfindet, sowie die Art der an der Interaktion beteiligten Re-
25 zeptoren (Pulendran et al., Science 193, 253-256, 2001).

Die Isotypenverteilung von Immunglobulin gamma (IgG) gegen beide Antigene (HBsAg und p36/LACK) wurde bestimmt, da die Isotypen IgG1 und IgG2a die Ausprägung der gesamten Immunantwort widerspiegeln. Dabei sind IgG1 Subtypen charakteristisch für eine humorale Antwort, begleitet von einer verstärkten Ausschüttung von Interleukinen IL-4 und IL-10 durch aktivierte Lymphozyten; ein erhöhter
30

Spiegel von Subtyp IgG2a ist typisch für eine zelluläre Th1-Antwort, begleitet von erhöhter Ausschüttung von IFN γ und IL-12. Das Auftreten der Isotypen ist dabei nicht exklusiv, die relativen Titer können jedoch als Indikator für die dominante Art der entstandenen Immunantwort gewertet werden.

- 5 Die intradermale Applikation von HBsAg-kodierenden Plasmiden in Lösung führte nur zu einer Th2 – typischen Immunantwort (siehe Fig. 1). Eine Th1 typische Verschiebung der Antikörperisotypen durch Plasmid fand nicht statt (s. Fig. 3). Für eine Reihe medizinisch sehr relevanter Krankheiten ist allerdings die Erzeugung einer zytotoxischen Antwort wesentlich, hierzu gehören u.a. die Hepatiden, leukivirale
- 10 Infektionen wie HIV sowie Infektionen mit intrazellulären Parasiten. Insofern ist die erfindungsgemäße Erzeugung einer Th1-dominanten Immunantwort durch Peptidgekoppelte Genexpressionsvektoren nicht nur eine quantitative Verbesserung, weil mit weniger DNA ein höherer Titer erreicht wird. Vielmehr handelt es sich um eine qualitative Verbesserung gegenüber dem Stand der Technik, die nach den aus der
- 15 Literatur bekannten Daten keineswegs zu erwarten gewesen wäre.

- Der hinter dieser qualitativen Verschiebung stehende Mechanismus ist dabei z.Z. nicht geklärt. Die Tatsache, dass die Ligandenkopplung an die minimalistischen Expressionsvektoren zu einer Erhöhung der Reporter-Genexpression in-vitro führt (Ergebnisse nicht gezeigt), sagt nicht unbedingt eine erhöhte Immunisierung voraus,
- 20 noch weniger deren T_H- Subtyp. Eine Verringerung der applizierten DNA-Menge sollte, wenn überhaupt eine Vorhersage getroffen werden könnte, nach derzeitigem Kenntnisstand durch die Verringerung der Adjuvans-Wirkung der zugeführten bakteriellen immunstimulatorischen DNA-Motive zu einer Th2 – Antwort führen. Bei den untersuchten Vektoren mit NLS-und T-Peptid ist das Gegenteil der Fall

- 25 Die Ergebnisse des Impfversuchs gegen das p36 LACK Antigen von L. major zeigen, dass das erfindungsgemäße Mittel in seiner Schutzwirkung das im Stand der Technik als derzeit „bestes“ bezeichnete Impfbregime der Zweitimmunisierung (Boost) mit rekombinantem Vaccinia Virus (rVV) übertrifft und vermeidet zusätzlich die möglichen Nebenwirkungen, die von Plasmiden und attenuierten Viren ausgehen,
- 30 und ist doch gleichzeitig vergleichbar in seiner Schutzwirkung (Gonzalo et al., Microbes and Infection:3 (9) :701-711). Bei gleicher bzw. besserer Schutzwirkung ist das erfindungsgemäße Mittel einfacher, billiger und vor allem sicherer herzustellen.

Die Ergebnisse für die in vivo Versuche mit HBsAg sind sehr überraschend, da diese mit einer erheblich geringeren DNA-Menge erzielt werden konnten, als bisher für die Immunisierung mit nicht adjuvantierter DNA ohne partikuläre Formulierung in der Literatur beschrieben war. Für die Immunisierung mit HBsAg geht man allgemein von einer Menge von 30 - 100 µg Plasmid bei intramuskulärer oder intradermalen Injektion aus (Schirmbeck et al., 1998, Vaccine. Vol.16, No.9/10: 949-954).

Die Vorteile der Erfindung lassen sich mithin wie folgt zusammenfassen.

- Minimalistische Nukleinsäurekonstrukte werden so modifiziert, dass die Immunantwort verbessert wird.
- diese modifizierten minimalistischen Nukleinsäurekonstrukte führen eine verstärkt zellulär vermittelte Immunantwort herbei.

Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen beschrieben; die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen und Figuren näher beschrieben. Es zeigt

- | | | |
|----|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 15 | Fig. 1 | ELISA zur Bestimmung des Gesamt-IgG gegen Hepatitis small surface Antigen (HBsAg) in Mäusen; |
| | Fig. 2 | ELISA zur Bestimmung des anti-HBsAg Gesamt-IgG nach Boost mit 1µg DNA; |
| 20 | Fig. 3 und 4 | Bestimmung der anti-HBsAg IgG Isotypen IgG 1 und IgG 2a; |
| | Fig. 5 | Ergebnisse eines Impfversuchs gegen das p36 LACK Antigen von Leishmania major. |

Ausführungsbeispiele

1. Aktivierung der Oligodesoxyribonukleotide (ODN) zur Kopplung von Thiol-funktionalisierten Molekülen

Die Kopplung von Molekülen wie Peptiden, Zuckern oder anderen Naturstoffen ist generell über eine Vielzahl von chemischen Reaktionen denkbar. Es sind Standardreaktionen zur Herstellung von Amid-, Ester- oder Imidbindungen aus dem Repertoire der organischen Synthesechemie hinreichend bekannt. Zur konzeptionellen Überprüfung wurde hier die Reaktion einer Thiolgruppe, die am zu koppelnden Molekül vorhanden war, mit einer Maleinsäureimidgruppe am Nukleinsäuremolekül verwendet. Die Maleinimidgruppe wurde über die Reaktion eines bei der Synthese des ODN eingefügten Aminorests (mit X gekennzeichnet) mit einem kommerziell erhältlichen bifunktionellen Kopplungsreagenz über eine Transamidierung des im Kopplungsreagenz vorliegenden NHS-Carbonsäurederivats in die Nukleinsäurekomponente der Reaktion eingeführt. Zur Herstellung von einfach modifizierten MIDGE-Konstrukten wurde das in der Haarnadelschleife mit einem aminogruppenmodifizierten desoxy-Uracil (XT) versehene ODN 1 sowie das nichtmodifizierte ODN 2 verwendet:

5'-PH-GGG AGT CCA GT XT TTC TGG AC (TIB-Molbiol, Berlin, Kurzbezeichnung: ODN 1 = Seq ID 5), wobei PH für am 5'-OH phosphoryliert steht.

und

5'-PH-AGG GGT CCA GTT TTC TGG AC (TIB-Molbiol, Berlin, Kurzbezeichnung: ODN 2 = Seq ID 6).

Das aminomodifizierte ODN 1 wurde wie folgt zur Kopplung eingesetzt: Der Crosslinker zur kovalenten Bindung (hier: sulfo-KMUS (N-(Maleimidoundecanoyloxy) sulfosuccinimid) in DMF, PIERCE Produkt-Nr. 21111) wurde in vier gleichen Teilen im Abstand von 30 min zu den Amino-ODN (0,1mM Endkonzentration) gegeben, bis eine Endkonzentration von 5 mM erreicht war. Die Reaktion erfolgte für zwei Stunden in einem Crosslink-Kopplungspuffer (50mM NaHPO₄, 75mM NaCl, pH 7,6) bei 37°C. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Tris-HCl (pH 7,5; 50 mM

Endkonzentration) gestoppt. Die aktivierten Amino-ODN wurden für 30 min bei –70 °C Ethanol-präzipitiert (300 mM NaOAc pH 5,3; 20 mM MgCl₂; 2,5-faches Reaktionsvolumen 100 % Ethanol abs.). Das Präzipitat wurde 30 min bei 15.000 rpm (4 °C) zentrifugiert und unter gleichen Bedingungen für 15 min mit 70 % Ethanol gewaschen. Die aktivierten Amino-ODN wurden abschließend in Wasser (MilliQ-Qualität) aufgenommen und bis zur Kopplung bei –20 °C eingefroren.

2. Kopplung von T- Peptid an aktivierte Oligodesoxyribonukleotide (ODN)

Die unter 1. beschriebenen aktivierten Amino-ODN wurden in Kopplungspuffer (1x = 50 mM NaHPO₄, 75 mM NaCl, pH 7,0) aufgenommen, so dass sich eine 0,1 millimolare Endkonzentration ergab. Anschließend wurde das in Wasser gelöste T-Peptid mit der Sequenz YGRKKRRQRRR (= Seq ID 3; hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Peter Henklein, Charité, Berlin) in 0,2 mM Endkonzentration zugegeben. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für eine Stunde.

Die Reinigung und Trennung der resultierenden Peptid-gekoppelten ODN von den nicht gekoppelten ODN erfolgte mittels Reversed Phase-HPLC. Die einzelnen Reaktionen wurden gelelektrophoretisch analysiert. Die HPLC-Fraktion mit den T-ODN wurde in einer Vakuumzentrifuge eingeeengt und in MilliQ-Wasser aufgenommen. Die modifizierten ODN wurden über eine Nukleosil-300 C18 Säule (10µm, 250mm Länge x 8mm Innendurchmesser) HPLC gereinigt. Der Gradient verlief von 0% Puffer A (100mM Ammoniumcarbonat) auf 42% Puffer B (80% Acetonitril) in 47min bei einer Flussrate von 2,4ml/min.

3. Kopplung von SV-40 NLS Peptid an aktivierte ODN

Die unter 1. beschriebenen aktivierten Amino-ODN wurden in Kopplungspuffer (1x = 50 mM NaHPO₄, 75 mM NaCl, pH 7,0) aufgenommen, so dass sich eine 0,1 mM Endkonzentration ergab. Anschließend wurde das in Wasser gelöste Peptid SV-40 NLS mit der Sequenz PKKKRKV (= Seq ID 4; Dr. Henklein) in 0,2mM Endkonzentration zugegeben. Die Reaktion erfolgte bei 37°C für eine Stunde.

Die Reinigung und Trennung der resultierenden Peptid-gekoppelten ODN von den nicht gekoppelten ODN erfolgte mittels Reversed Phase-HPLC. Die einzelnen Reak-

tionen wurden gelelektrophoretisch analysiert. Die HPLC-Fraktion mit den NLS-ODN wurde in einer Vakuumzentrifuge eingengt und in MilliQ-Wasser aufgenommen.

4. Herstellung von MIDGE – HBsAg T-Peptid

MIDGE sind minimalistische Expressionsvektoren aus doppelsträngiger DNA, die nur aus der Expressionskassette, d.h. aus dem CMV Promotor, einem Intron, der entsprechenden Gensequenz und einer Polyadenylierungssequenz bestehen. Die Konstrukte wurden wie folgt erhalten: Das Plasmid pMOK HBsAg wurde mit Eco 31I vollständig verdaut. Die Ligation mit 5' phosphorylierten haarnadelförmigen ODN 1, an das das T-Peptid entsprechend 1. gekoppelt war, und ODN 2 erfolgte durch T4 DNA Ligase in Anwesenheit von Eco 31I und wurde durch Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Das resultierende Gemisch wurde konzentriert und mit Eco 31I und T7 Polymerase in Abwesenheit von Desoxyribonukleotid-Triphosphaten behandelt. Die Aufreinigung erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie. Der Nachweis der erfolgreichen Kopplung der verschiedenen Liganden an die MIDGE erfolgte durch Restriktionsverdau. Durch gelelektrophoretischen Größenvergleich der vom MIDGE Vektor (mit BamHI bzw. EcoRI) abgeschnittenen ODN mit entsprechenden Kontroll-ODN wurde bestätigt, dass die Vektoren mit Peptiden gekoppelt waren. (Die Sequenz HbsAg ist in Seq. ID 1 wiedergegeben)

Die Herstellung von MIDGE – HBsAg NLS-Peptid erfolgte entsprechend.

20 5. Klonierung des Plasmids pMOKp36

Vom Ausgangsplasmid pSCp36 wurden 2 Fragmente mittels PCR amplifiziert:

1. PCR ca. 800 bp;

Primer: links 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT (= Seq ID 7),

Primer: rechts 5'-TTATATGAGCTCAGAAGACACGGACAGGGACCTCTTCCGTCG
(= Seq ID 8)

2. PCR ca. 950 bp;

Primer: links 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT (= Seq ID 9),

Primer: rechts 5'-TTATATGAGCTCTTACTCGGCCGTCGGAGATGG (= Seq ID 10)

Das PCR-Produkt aus der 2. PCR wurde mit Eco31I geschnitten und das kleinere Fragment (ca. 200 bp) isoliert.

Das PCR-Produkt aus der 1. PCR wurde mit Bpil geschnitten.

- 5 Das 200 bp Fragment und das geschnittene Fragment aus der 1. PCR wurden zusammenligiert und anschließend mit KpnI und SacI geschnitten und in den mit KpnI und SacI geschnittenen pMOK-Vektor ligiert. Das entstandene Plasmid erhielt den Namen pMOK p36. Daraus wurde MIDGE p36-NLS hergestellt. (Die Sequenz p36 LACK ist in Seq. ID 2 wiedergegeben)
- 10 Die Aktivierung der ODN, die Kopplung der NLS Sequenz an die Oligonukleotide und die Herstellung der MIDGE p36-NLS erfolgte wie zuvor beschrieben.

Ergebnisse

Die Ergebnisse werden anhand der Figuren im Detail nachfolgend beschrieben:

- 15 Fig. 1 zeigt die Bestimmung des Gesamt IgG HBsAg Titers. Der Titer wurde mittels ELISA Verfahren bestimmt, wobei die Absorption in OD (Optische Dichte) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm bestimmt wurde. Als Vergleich wurden Plasmid und unmodifizierter MIDGE Vektor eingesetzt. Die MIDGE mit den verschiedenen Kopplungen zeigten eine deutliche Erhöhung des Antikörpertiters, der auf eine verstärkte Expression des HBsAg hinweist. Dabei bedeutet:

- 20 pMOK: Plasmid.
MIDGE: unmodifizierter MIDGE
M-NLS: MIDGE-NLS gekoppelt
M-TAT: MIDGE mit T-Peptid gekoppelt

- Fig. 2 zeigt den Boosteffekt der Zweitimmunisierung mit $1\mu\text{g}$ DNA nach 11 Wochen.
- 25 Die bei der Erst- und auch bei der Zweitimmunisierung eingesetzte DNA-Menge betrug $1\mu\text{g}$ DNA. Auch hier zeigten die modifizierten MIDGE einen die erzeugte Immunantwort erheblich verstärkenden Effekt.

Fig. 3 und 4 zeigen die Bestimmung der IgG Isotypen IgG 1 und IgG 2a gegen HBsAg. Überraschenderweise lösten mit dem T-Peptid und mit der NLS-Sequenz gekoppelte MIDGE eine nach der Antikörper-Isotypenverteilung zytotoxische Immunantwort (Th1) aus.

- 5 Fig. 5 zeigt das Verhältnis der Antikörper-Isotypen Verteilung IgG 2a und IgG 1 nach Zweitimmunisierung und Belastungsinfektion mit *Leishmania major* Promastigoten. Das Impfreime MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS zeigt den unerwarteten Effekt der Auslösung einer zellulären (Th1) Immunantwort. Der durch das Regime pMOKp36/rVVp36 ausgelöste Th2/Th1 shift in der Immunantwort unterscheidet sich
10 nur gering.

Beispiel 1: HBsAg Antikörpertiterbestimmung in Mäusen

- Gemäß Beispiel 4 wurden für das Hepatitis-B-Oberflächenantigen HBsAg (Subtyp ay) kodierende MIDGE hergestellt. Der Nachweis der Expression erfolgte durch Antikörpertiterbestimmung gegen das Hepatitis B Antigen mittels ELISA. Die MID-
15 GE-Herstellung erfolgte entsprechend Ausführungsbeispiel 4. Im Einzelnen wurden unmodifizierte MIDGE und MIDGE mit einem Liganden, nämlich Migde-NLS und MIDGE-T hergestellt. Als zusätzliche Kontrolle wurde das Plasmid pMOK HBsAg eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden die Seren unbehandelter Mäuse benutzt.

- MIDGE (unmodifiziert sowie NLS-modifiziert) und Plasmid wurden gelöst in Natriumphosphat pH 7,2 in einem Volumen von 50 µl intradermal in Balb/c Mäuse injiziert. Die DNA- Mengen betrugen 10 µg bzw. 1µg pro Tier pro Impfung. Pro Gruppe wurden 5 Mäuse verwendet. Nach 11 Wochen erfolgte eine Zweitimmunisierung (Boost). Die Antikörpertiterbestimmung aus den Seren erfolgte nach Woche 2, 4 und 8. Die Ergebnisse sind in Fig. 1 dargestellt. Bei eingesetzten 10 µg DNA zeigt sich
20 in der vierten Woche ein deutlicher Anstieg des Gesamt-Immunglobulin-G (IgG) Titer und damit die verstärkte Expression von HBsAg durch alle MIDGE Konstrukte gegenüber Plasmid. Den größten Effekt bewirkten die modifizierten MIDGE. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Eingesetzte 1µg DNA führte zunächst zu keiner nennenswerten Steigerung des HBsAg Titer in Woche 4 (Ergebnisse nicht gezeigt); jedoch zeigte sich überraschenderweise ein starker Anstieg des
25
30

Titers nach dem Boost mit 1µg in Woche 11. Wiederum zeigten die modifizierten MIDGE den stärksten Effekt (siehe Fig. 2). Diese Ergebnisse zeigen, dass auch mit minimaler DNA-Menge durch MIDGE ein hoher HBsAg-Antikörpertiter erreicht wird.

Beispiel 2: Impfversuch gegen das Leishmania p36 Antigen

- 5 Zur Erzeugung eines effektiven Impfschutz gegen Leishmania major wurde das 36 kDa, auch als LACK, bezeichnete Antigen eingesetzt. In einem Impfversuch wurden verschiedene, für das immunogene p36 kodierende, Genfähren benutzt: MIDGE mit NLS Kopplung, Plasmid pMOKp36 und rekombinanter Vaccinia Virus p36 (rVV). Um einen Vergleich für das wirksamste prime/boost Regime zu erhalten, wurden die
- 10 Konstrukte nach folgendem Impfregime in weibliche (Balb/c) Mäuse injiziert.

Gruppen	Erstimmunisierung (prime)	Zweitimmunisierung (boost)
1	pMOKp36	pMOKp36
2	MIDGE p36-NLS	MIDGE p36-NLS
3	pMOK Kontrolle	pMOK Kontrolle
4	pMOKp36	rVVp36
5	MIDGE p36-NLS	rVVp36
7	Phosphatpuffer	Phosphatpuffer

Je Gruppe wurden 10 Mäuse eingesetzt.

Die verwendeten DNA Mengen betrugen für:

pMOKp36: 100µg, i.d.

- 15 MIDGE p36-NLS: 54,8µg, i.d.

rVV p36: 5×10^7 pfu/Maus, i.p.

und wurden in Natriumphosphatpuffer pH 7,2 gelöst, verabreicht.

Nach 2 Wochen erfolgte die 2. Impfung (boost) mit den entsprechenden (s. Tab.) DNA Konstrukten. Drei Wochen nach dem Boost erfolgte die Belastungsinfektion mit

20 5×10^4 Leishmania major Promastigoten. Diese wurden den Mäusen in die rechte Hinterpfote s.c. injiziert.

Acht Wochen nach der Belastungsinfektion wurden von allen Mäusen die Seren gewonnen. Der Gesamt IgG Antikörpertiter gegen das p36 Antigen und die Bestimmung der IgG 2a und IgG 1 Antikörper erfolgte mittels ELISA, wobei die Absorption in OD (Optische Dichte) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 406 \text{ nm}$ bestimmt wurde.

Patentansprüche

- 5 1. Arzneimittel zur Erzeugung einer Immunantwort, bestehend aus einem oder mehreren in eukaryoten Zellen operablen Genexpressionskonstrukten, welche ein oder mehrere Antigene unter Kontrolle einer Promotersequenz kodieren, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Oligopeptid mit dem Expressionskonstrukt kovalent verbunden ist.
- 10 2. Arzneimittel nach Anspruch 1, wobei das Expressionskonstrukt für das Hepatitis small surface Antigen (HBsAg) kodiert.
3. Arzneimittel nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Oligopeptid eine Länge von fünf bis 25 Aminosäuren hat und mindestens die Hälfte der Aminosäuren zu der Gruppe Lysin oder Arginin gehören.
- 15 4. Arzneimittel nach Anspruch 3, wobei das Oligopeptid eine Kernlokalisationssequenz trägt.
5. Arzneimittel nach den Ansprüchen 3 oder 4, wobei das Oligopeptid die Sequenz PKKKRKV (Prolin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin) enthält.
6. Arzneimittel nach den Ansprüchen 3 oder 4, wobei das Oligopeptid die Sequenz YGRKKRRQRRR enthält.
- 20 7. Arzneimittel nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Genexpressionskonstrukt ein linear-doppelsträngiges Desoxyribonukleinsäuremolekül ist, welches an beiden Enden des Doppelstrangs durch eine kurze Schleife einzelsträngiger Nukleosidreste kovalent geschlossen ist.
- 25 8. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 1 bis 7 als Impfstoff zur Anwendung am Menschen.

Fig. 1

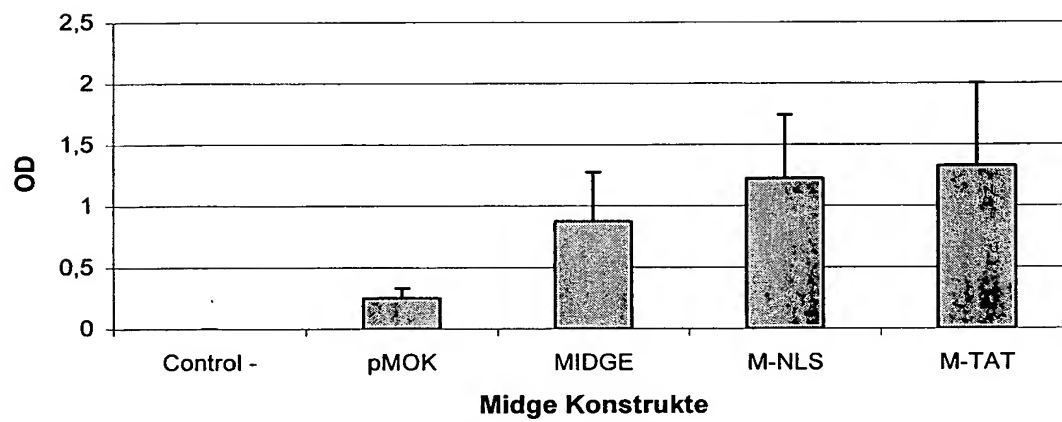


Fig. 2

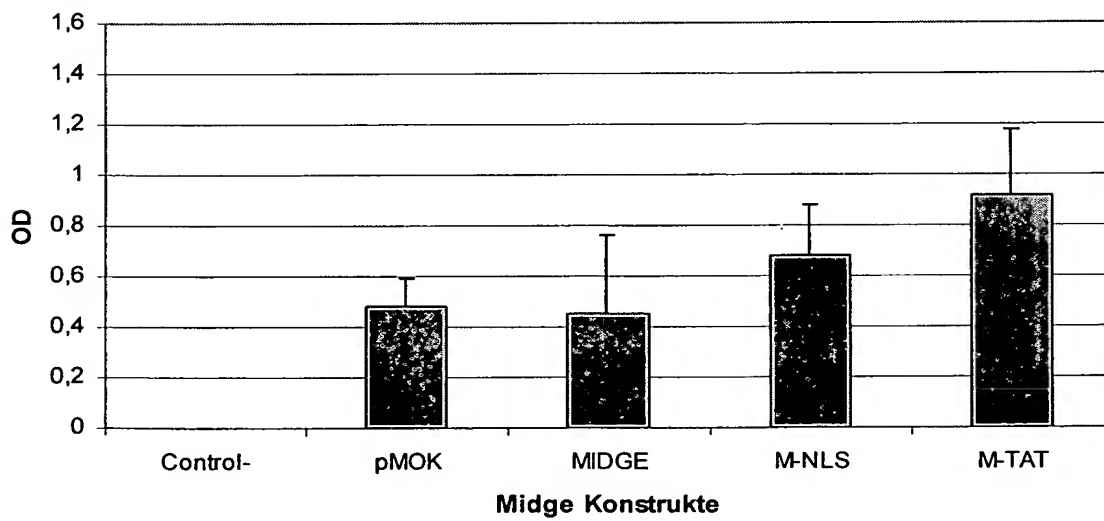


Fig. 3

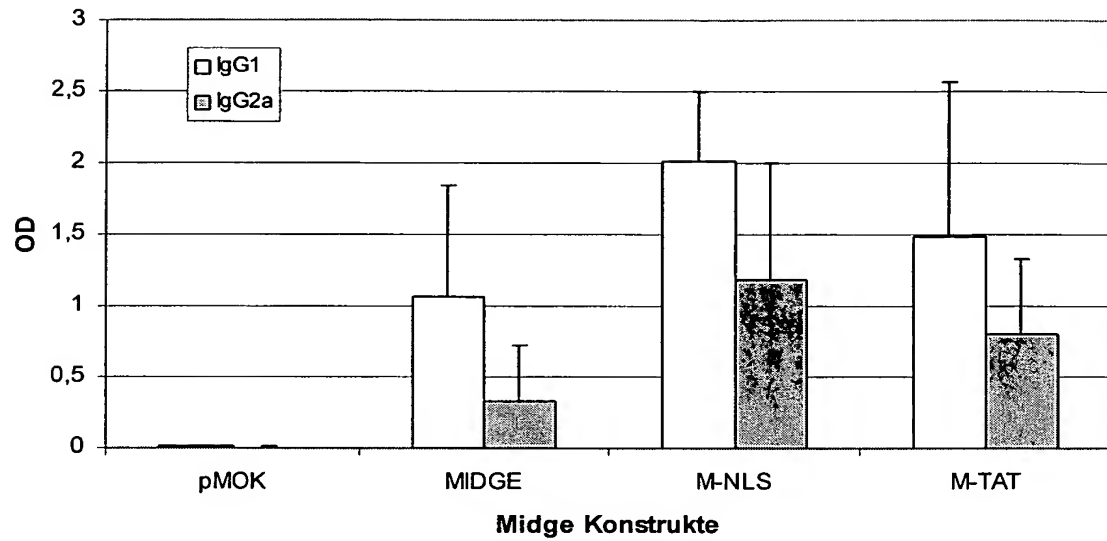


Fig. 4

Konstrukte	IgG2a/IgG1
pMOK	0,4
Midge	0,31
M-NLS	0,59
M-TAT	0,54

Fig. 5

Impfregime	IgG2a/IgG1
pMOK p36/pMOK p36	0,9
Midge p36-NLS/Midge p36-NLS	1,3
pMOK ctr/pMOK ctr	1
Midge p36-NLS/rVVp36	1,35
pMOK p36/rVVp36	1,66
Phosphatpuffer/Phosphatpuffer	0,96

Zusammenfassung

- Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Erzeugung einer zytotoxischen Immunantwort nach Injektion von Antigen-kodierenden Expressionskonstrukte. Erfindungsgemäss werden minimalistische Expressionskonstrukte verwendet, die nur aus Promoter, kodierender Sequenz und einem Terminator bestehen und an den Enden mit haarnadelförmigen Oligonukleotiden versehen sind, in deren Schleife basische Peptide kovalent gekoppelt sind. Diese peptidgekoppelten Expressionskonstrukte führen nach intradermaler Injektion zu einem deutlich zellvermittelten Antworttyp.
- 5

Mologen-Immunantwort.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Mologen Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH

<120> Mittel zur Verbesserung der Immunantwort

<130> XI 628/01

<150> DE 101 48 697.9

<151> 2001-10-02

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4533

<212> DNA

<213> pMOK HBsAg

<220>

<221> misc_feature

<222> (1839)..(1045)

<223> Kanamycin resistance, reverse complementary

<220>

<221> polyA_site

<222> (4080)..(4281)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (2447)..(3243)

<223> CMV

Mologen-Immunantwort.ST25

<220>

<221> Intron

<222> (3250)..(3386)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (3393)..(4073)

<223> Insert HBSAg subtyp ay

<400> 1
tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta 60
tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag 120
aacatgtctc gggaggcctc acgtgacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccagggaac 180
cgtaaaaagg ccgcggttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac 240
aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg 300
tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac 360
ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtagggtat 420
ctcagttcgg tgtaggctcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag 480
cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggg aagacacgac 540
ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt 600
gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt 660
atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 720
aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga 780
aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac 840
gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc 900
cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggctc 960
gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca 1020
tccatagttg cctgactccc cgtctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat 1080
gcgctgcgaa tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc 1140
gccaaagtct tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac 1200
acccagccgg ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg 1260
caagcaggca tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc tcgccttgag 1320
cctggcgaac agttcggtcg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc 1380

Mologen-Immunantwort.ST25

gacaagaccg gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc	1440
gaatgggcag gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga	1500
tactttctcg gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa	1560
tagcagccag tcccttcccc cttcagtgc aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc	1620
cgtcgtggcc agccacgata gccgcgctgc ctcgtcttgc agttcattca gggcaccgga	1680
caggtcggtc ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc	1740
atcagagcag ccgattgtct gttgtgcccc gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc	1800
ggccggagaa cctgcgtgca atccatcttg ttcaatcata atattattga agcatttatc	1860
agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag	1920
gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc attattatca	1980
tgacattaac ctataaaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgtctcgcg cgtttcggtg	2040
atgacggtga aaacctctga cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag	2100
cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc ggggtgttggc ggggtgtcggg	2160
gctggcttaa ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag agtgcaccat atgcggtgtg	2220
aaataccgca cagatgcgta aggagaaaaat accgcatcag gcgccattcg ccattcaggc	2280
tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcgggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga	2340
aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac	2400
gttgtaaaac gacggccagt gccaaagcttg gtctcctccc ggatcctcaa tattggccat	2460
tagccatatt attcattggg tatatagcat aaatcaatat tggctattgg ccattgcata	2520
cgttgtatct atatcataat atgtacattt atattggctc atgtccaata tgaccgccat	2580
gttggcattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata	2640
gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgct ggctgaccgc	2700
ccaacgacc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag	2760
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac	2820
atcaagtgta tcatatgcca agtccgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccc	2880
cctggcatta tgcccagtac atgaccttac gggactttcc tacttggcag tacatctacg	2940
tattagtcac cgctattacc atgggtgatgc gggttttgga gtacaccaat gggcgtggat	3000
agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt	3060
tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa taaccccgcc ccgttgacgc	3120
aaatgggcgg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagaggtcgt ttagtgaacc	3180
gtcagatcac tagaagcttt attgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca	3240
gtgctcgagc aggtaagtat caaggttaca agacaggttt aaggaggcca atagaaactg	3300
ggcttgtcga gacagagaag actcttgcgt ttctgatagg cacctattgg tcttactgac	3360
atccactttg cctttctctc cacaggggta ccatggagaa catcacatca ggattcctag	3420

Mologen-Immunantwort.ST25

```

gaccccttct cgtgttacag gcggggtttt tcttggtgac aagaatcctc acaataccgc 3480
agagtctaga ctctgtgttg acttctctca attttctagg gggaactacc gtgtgtcttg 3540
gccaaaattc gcagtcccca acctccaatc actcaccaac ctcttgctct ccaacttgtc 3600
ctggttatcg ctggatgtgt ctgcggcggt ttatcatctt cctcttcac cgtctgctat 3660
gcctcatctt cttgttggtt cttctggact atcaagggtat gttgcccggt tgcctcttaa 3720
ttccaggatc ctcaacaacc agcacgggac catgccggac ctgcatgact actgctcaag 3780
gaacctctat gtatccctcc tgttgctgta ccaaacttc ggacggaaat tgcacctgta 3840
ttcccatccc atcatcctgg gctttcggaa aattcctatg ggagtgggcc tcagcccggt 3900
tctcctggct cagtttacta gtgccatttg ttcagtgggt cgtagggtt tccccactg 3960
tttggtttc agttatatgg atgatgtggt attgggggcc aagtctgtac agcatcttga 4020
gtccctttt accgctgtta ccaattttct tttgtctctg ggtatacatt taagagctcg 4080
atgagtttg acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaa atgctttatt tgtgaaattt 4140
gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca 4200
attgcattca ttttatgttt cagggtcagg gggaggtgtg ggaggttttt taaagcaagt 4260
aaaacctcta caaatgtggt agaattcagg gggagacca attcgtaatc atggtcatag 4320
ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc 4380
ataaagtgta aagcctgggg tgcctaatga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcg 4440
tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa 4500
cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgc 4533

```

<210> 2

<211> 4791

<212> DNA

<213> Plasmid pScp36

<220>

<221> misc_feature

<222> (1939)..(1045)

<223> kanamycin resistance, reverse complementary

<220>

<221> promoter

<222> (2447)..(3243)

<223> CMV

Mologen-Immunantwort.ST25

<220>

<221> Intron

<222> (3250)..(3386)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (3393)..(4331)

<223> p36 protein

<220>

<221> polyA_site

<222> (4338)..(4539)

<223> poly A site aus SV 40

<400> 2

tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggtg	60
tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa gcgaggaaag	120
aacatgtctc gggaggcctc acgtgacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac	180
cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac	240
aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg	300
tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac	360
ctgtccgcct ttctcccttc ggggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat	420
gcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag	480
cccgaccgct gcgccttatc cggtaaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac	540
ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt	600
gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt	660
atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc	720
aaacaaacca ccgctggtag cggtgggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga	780
aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac	840
gaaaactcac gttaagggat tttggtcacg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc	900
cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatac atctaaagta tatatgagta aacttggtct	960
gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca	1020
tccatagttg cctgactccc cgtctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat	1080

Mologen-Immunantwort.ST25

gcgctgcgaa	tcgggagcgg	cgataccgta	aagcacgagg	aagcggtcag	cccattcgcc	1140
gccaagctct	tcagcaatat	cacgggtagc	caacgctatg	tcctgatagc	ggcccgccac	1200
acccagccgg	ccacagtcga	tgaatccaga	aaagcggcca	ttttccacca	tgatattcgg	1260
caagcaggca	tcgccatggg	tcacgacgag	atcctcgccg	tcgggcatgc	tcgccttgag	1320
cctggcgaac	agttcggctg	gcgcgagccc	ctgatgctct	tcgtccagat	catcctgatc	1380
gacaagaccg	gcttccatcc	gagtacgtgc	tcgctcgatg	cgatgtttcg	cttggtggtc	1440
gaatgggcag	gtagccggat	caagcgtatg	cagccgccgc	attgcatcag	ccatgatgga	1500
tacttttctg	gcaggagcaa	ggtgagatga	caggagatcc	tgccccggca	cttcgccccaa	1560
tagcagccag	ttcctttccc	cttcagtgc	aacgtcgagc	acagctgcgc	aaggaacgcc	1620
cgtcgtggcc	agccacgata	gccgcgctgc	ctcgtcttgc	agttcattca	gggcaccgga	1680
caggctcggtc	ttgacaaaaa	gaaccgggcg	cccctgcgct	gacagccgga	acacggcggc	1740
atcagagcag	ccgattgtct	gttgtgcca	gtcatagccg	aatagcctct	ccaccaagc	1800
ggccggagaa	cctgcgtgca	atccatcttg	ttcaatcata	atattattga	agcatttatc	1860
agggttattg	tctcatgagc	ggatacatat	ttgaatgtat	ttagaaaaat	aaacaaatag	1920
gggtttccg	cacattttcc	cgaaaagtgc	cacctgacgt	ctaagaaacc	attattatca	1980
tgacattaac	ctataaaaaa	aggcgtatca	cgaggccctt	tcgtctcgcg	cgtttcggtg	2040
atgacggtga	aaacctctga	cacatgcagc	tcccgagagc	ggtcacagct	tgtctgtaag	2100
cggatgccgg	gagcagacaa	gcccgtcagg	gcgcgtcagc	gggtgttggc	gggtgtcggg	2160
gctggcttaa	ctatgcggca	tcagagcaga	ttgtactgag	agtgcaccat	atgcggtgtg	2220
aaataccgca	cagatgcgta	aggagaaaaa	accgcatcag	gcgccattcg	ccattcaggc	2280
tgcgcaactg	ttgggaagg	cgatcggtgc	gggcctcttc	gctattacgc	cagctggcga	2340
aagggggatg	tgctgcaagg	cgattaagtt	gggtaacgcc	agggttttcc	cagtcacgac	2400
gttgtaaaac	gacggccagt	gccaagcttg	gtctcctccc	ggatcctcaa	tattggccat	2460
tagccatatt	attcattggt	tatatagcat	aatcaatat	tggctattgg	ccattgcata	2520
cgttgtatct	atatcataat	atgtacattt	atattggctc	atgtccaata	tgaccgccat	2580
gttggcattg	attattgact	agttattaat	agtaatcaat	tacgggggtca	ttagttcata	2640
gcccataatat	ggagttccgc	gttacataac	ttacggtaaa	tggcccgctt	ggctgaccgc	2700
ccaacgaccc	ccgccattg	acgtcaataa	tgacgtatgt	tcccatagta	acgccaatag	2760
ggactttcca	ttgacgtcaa	tgggtggagt	atttacggta	aactgcccac	ttggcagtac	2820
atcaagtgtg	tcatatgcca	agtcggcccc	ctattgacgt	caatgacggg	aaatggcccc	2880
cctggcatta	tgcccagtac	atgaccttac	gggactttcc	tacttggcag	tacatctacg	2940
tattagtcac	cgctattacc	atgggtgatgc	ggttttggca	gtacaccaat	gggcgtggat	3000
agcggtttga	ctcacgggga	tttccaagtc	tccaccccat	tgacgtcaat	gggagtttgt	3060
tttggcacca	aaatcaacgg	gactttccaa	aatgtcgtaa	taaccccgcc	ccgttgacgc	3120

Mologen-Immunantwort.ST25

```

aatgggagg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagggtcgt ttagtgaacc 3180
gtcagatcac tagaagcttt attgcggttag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca 3240
gtgctcgagc aggttaagtat caagggttaca agacagggtt aaggaggcca atagaaactg 3300
ggcttgtcga gacagagaag actcttgcgt ttctgatagg cacctattgg tcttactgac 3360
atccactttg cttttctctc cacaggggta ccatgaacta cgagggtcac ctgaagggcc 3420
accgcggatg ggtcacctcc ctggcctgcc cgcagcaggc ggggtcgtac atcaagggtg 3480
tgtcgacgtc gcgcgatggc acggccatct cgtggaaagc caaccccgac cgccacagcg 3540
tggacagcga ctacgggtctg ccgagccacc gcctcgaggg ccacaccggc ttcgtgtcgt 3600
gtgtgtcgct ggcccacgcc accgactacg cgctgaccgc gtcctgggac cgctccatcc 3660
gcatgtggga cctgcgcaat ggccagtgcc agcgcaagtt cctgaagcac accaaggacg 3720
tgctcgccgt cgccttctcg ccggacgacc gcctgatcgt gtccgcgggc cgcgacaacg 3780
tgatccgct gtggaacgtg gcgggagagt gcatgcacga gttcctgcgc gacggccacg 3840
aggactgggt gagcagcatc tgtttctcgc cgtcgctgga gcatccgac gtggtgtccg 3900
gcagctggga caacaccatc aaggatgga acgtgaacgg gggcaagtgt gagcgacgc 3960
tcaagggcca cagcaactac gtgtccacgg tgacggtgtc gccagacggg tcgctgtgcg 4020
cgtccggcgg caaggacggc gcggcgctgc tgtgggacct gagcaccggc gagcagctgt 4080
tcaagatcaa cgtggagtcg cccatcaacc agatcgctt ctcgccaac cgcttctgga 4140
tgtgcgtcgc gacggagagg tccctgtccg tgtacgacct ggagagcaag gctgtgattg 4200
cggagctgac gccggacggc gcgaagccgt ccgagtgcac ctccattgcc tgggtccgcc 4260
acggcaacac tctgtactcc ggtcacaagg acaacctgat ccgctgtgtg tccatctccg 4320
acgccgagta agagctcgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaat 4380
gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata agctgcaata 4440
aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg 4500
aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtag aattcagggg gagaccaat 4560
tcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac 4620
aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaattgagt gagctaactc 4680
acattaattg cgttgcgctc actgcccgt ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg 4740
cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg c 4791

```

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1, TAT peptide

Mologen-Immunantwort.ST25

<400> 3

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Simian virus 40, NLS peptide

<400> 4

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> ODN 1

<220>

<221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> xT = Thymin modified with a reactive amino group

<400> 5
gggagtcag ttttctggac

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> ODN 2

<400> 6
aggggtccag ttttctggac

20

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> 1. PCR: Primer left

Mologen-Immunantwort.ST25

<400> 7 33
ttatatggta ccatgaacat acgaggggtca cct

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> 1. PCR: Primer right

<400> 8 42
ttatatgagc tcagaagaca cggacaggga cctcttccgt cg

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> 2. PCR: Primer left

<400> 9 33
ttatatggta ccatgaacat acgaggggtca cct

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> 2. PCR: Primer right

<400> 10 33
ttatatgagc tcttactcgg ccgtcggaga tgg